Standar Nasional Indonesia

SNI 01-2332-1991

Produk perikanan, Penentuan escherichla coli

ICS 67.120.30

Badan Standardisasi Nasional

Daftar isi

Produk perikanan, Penentuan escherichla coli

0. Pendahuluan

Mikroorganisma coliform adalah aerobik sampai fakultatif anaerobik, berbentux bulat, gram negatif, tidak membentuk spora. dapat memfermentasi laktosa dengan dihasilkannya asam dan gas pada suhu 32¯35°C selama 4S jam. Coliform digunakan sebagai mikroorganisma indikator pada kontrol sanitasi. Mereka sebagian besar tidak berbahaya kecuali pada beberapa strain seperti E. colt yang mempunyai shat patogenik terutama pada orang-orang tua dan anak-anak. E. colt secara normal hidup dalam usus manusia dan binatang-binatang yang berdarah panas', maka hadirnya E. colt di dalam makanan atau air menunjukkan adanya kontarninasi kotoran. Enterobacter aerogenes juga anggota dart kelompok coliform dan biasa dijumpai pada tumbuh-tumbuhan, padi-padian dan tanah.

1 Metode Standar

1.1 Peralatan.

1.1.1 Sama dengan peralatan yang digunakan pada pengujian TPC (B, 1—5).
1.1.2 Water bath bertutup dengan sistem sirkullasi, 45,5°Ca- 0,05°C.
1.1.3 Jarum inokulasi dengan diameter bagian dalam 3 mm.

1.2 Media dan Reagensia.

1.2.1 Brilliant green lactose bile broth 2 % (BGLB).
1.2.2 Laurel sulfate tryptose broth (LST).
1.2.3 EC broth.
1 2.4 Levine's eosine methylene blue agar (L—EMB).
1.2.5 Trvutone atau trypticase broth.
1.2.6 Buffered glucosa broth (Media MR—VP).
1.2.7 Media Koser citrate.
1.2.5 Standard plate count agar (PCA)
1.2.9 Reagens:a Novae.
1.2.10 Reagensia Voges — Proskaurer.
1.2.11 Pewarnaan gram.
1.2.12 Larutan methylene.

1.3 Tes presumptive untuk colifom .

1.3.1 Denran menggunakan pipet steril, siapkan larutan dengan pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-3} dan lebih bila perlu. Aduk sampai homogen.
1.3.2 Inokulasi pada LST broth masing-masing 3 tabung dengan 1 ml larutan.

1.3.3 Pegang pipet menyudut sehingga bagian bawah dari pipet menyentuh dinding tabung.
1.3.4 Biarkan larutan dalam pipet mengalir. Jangan meniup larutan ke luar dari pipet.
1.3.5 Inkubasi tabung-tabung tersebut selama 48 ± 2 jam. pada suhu 35°C.
1.3.6 Periksa tabung-tabung yang telah mengandung gas pada 24 ± 2 jam, tabung-tabung ini adalah tabung yang positif.
1.3.7 Perhatikan perubahan warna yang terjadi sambil menggoyangkan tabung perlahan-lahan.
1.3.8 Setelah pemeriksaan tersebut, inkubasikan kembali tabung-tabung yang negatif selama 24 jam.
1.3.9 Perhatikan gas yang terbentuk selama 48 ± 2 jam. Tabung-tabung ini adalah tabung positif dalam tes presumtiv untuk mikroorganisma coliform.
1.3.10 Lakukan "Tes Konfirmasi" pada tabung-tabung yang positif.

1.4 Tes Konfirmasi untuk coliform.

1.4.1 Kocok perlahan-lahan tabung-tabung LST positif.
1.4.2 Pindahkan dengan menggunakan jarum inokulasi berdiameter 3 mm ke tabung-tabung BULB 2% dan tabung-tabung EC broth. Inokulasi pada EC broth dilakukan duplo di mana satu digunakan untuk "Tes Konfirmasi" E. coli.
1.4.3 Pegang tabung LST menyudut dan masukkan jarum inokulasi secara hati-hati, tanpa membentuk selaput.
1.4.4 Inkubas. BGLB broth selama 48 ± 2 jam pada suhu 35°C.
1.4.5 Periksa tabung-tabung BGLB positif seperti pada butir 1.3.7 - 1.3.10.
1.4.6 Dengan menggunakan tabel "Most Probable Number (MMPN)" terlampir tentukan nilai N1PN berdasarkan pada jumlah tabung-tabung BGLB yang mengandung gas pada 48 ± 2 jam dengan suhu 25°C.
1.4.7 Hitung sebagai MPN coliform per gram (lihat lampiran).

1.5 Tes Konfirmasi untuk E. coli

1.5.1 Kocok secara perlahan-lahan tabung-tabung LST positif.
1.5.2 Pindahkan dengan menggunakan jarum inokulasi steril berdiamater 3 mm tiap-tiap tabung LST positif ke tabung EC broth.
1.5.3 Pegang tabung LST sehingga membuat sudut dan masukkan jarum inokulasi perlahan-lahan, hindarkan terbentuknya selaput.
1.5.4 Inkubasikan tabung-tabung EC broth pada water bath bersirkulasi dengan suhu 45,5°C ± 0,05°C selama 48 ± 2 jam.
1.5.5 Water bath harus dalam keadaan hersih dan tertutup, dan air di dalamnya harus lebih tinggi dan ketinggian cairan (medium) yang ada dalam tabung-tabung.
1.5.6 Tabung-tabung yang mengandung gas dalam waktu 24 jam atau 48 ± 2 jam tabung-tabung positif.

1.5.7 Kocok tabung-tabung EC positif perlahan-lahan, kemudian buat goresan pada L-EMB agar. Gunakan jarum inokulasi herdiameter 5 mm dan hindarkan terjadinya selaput.

1.5.8 Goreskan pada L—EMB agar sedemikian rupa sehingga tidak menyebabkan koloni yang bertumpuk. Usahakan jaraknya 0,5 cm.

1.5.9 Inkubasi pada suhu 35°C selama 18-24 jam.

1.5.10 Perhatikan koloni tersangka.

1.5.11 Dengan menggunakan jarum inokulasi ambil 2 koloni tersangka dari masing-masing L-EMB dan pindahkan pada PCA miring yang digunakan untuk tes biokimia.

1.5.12 Inkubasikan agar miring tersebut pada suhu 35°C selama 18-24 jam. Buat.pewarnaan gram dari tiap-tiap koloni. E. coil adalah gram--negatif dan tidak membentuk spora.

1.5.13 Lakukan tes biokimia dengan reaksi IMViC :

1.5.13.1 Produksi indol.

- Inokulasi 1 tabung Tryptone broth.
- Inkubasi pada suhu 35°C selama 24 ± 2 jam.
- Tes indol dengan menambahkan 0,2 - 0,3 ml reagensia Kovacs.
- Hasil positif adalah yang membentuk cincin merah pada lapisan bagain atas media.

1.5.13.2 Reaksi Voges - Proskauer dan Methyl red :

- Inokulasi 1 tabung media MR¯VP dari masing-masing PCA miring dan inkubasikan pada suhu 35°C selama 48 ± 2 jam.
- Pindahkan 0,7 ml larutan ke piling porselin secara aseptis.
- Tambahkan 0,2 ml larutan alkohol alpha¯napthol 5%, 0,1- ml KOH dan sedikit kristal creatine.
- Tes adalah positif bila memberikan warna merah muda eosin dalam waktu 2 jam.
- Inkubasi kembali tabung MR—VP medium 48 jam lagi pada suhu 35°C.
- Tambahkan 5 tetes indikator Methyl red pada masing-masing tabung.
- Kolonl adalah MR + (positif) jika memberi warna merah dan MR — (negatif) jika memberi warna kuning.

1.5.13.3 Penggunaan sitrat (Koser's citrate broth) :

- Secara hati-hati inokulasi tabung berisi Koser's citrate medium dengan menggunakan jarum inokulasi yang lurus untuk memecah permukaannya. Penggunaan inokulum banvak akan menyebabkan terbawanva nutrien lainnya.
- lnkubasi pada subu 35°C selama 96 jam.
- Tes adalan positif jika menunjukan terjadinya pertumbuhanpada tabung.

1.5.14 Pembentukan gas dari lactose.

a). Inokulasi I tabung LST broth dari masing-masing PCA miring.

b). Inkulasi pada suhu 35^{O}C selama 48 jam.

c). Perhatikan terbentuknya gas sepert i pada butir 1.3.7 - 1.3.10.

1.5.15 Klasifikasi dan pelaporan.

1.5.15.1 Klasifikasi E. coil apabila reaksi IMViC adalah + + - - atau - + - - dan pewarnaan gram menunjukkan gram negatif dan tidak berspora yang membentuk gas di LST broth pada inkubasi selama 48 = 2 jam.

1.5.15.2 Tentukan MPN untuk E. coli dengan menggunakan tabel MPN herdasarkan pada jumlah tabung-tabung pada "tes konfirmasi" dengan IMViC (+ + - - - + - -), fermentasi laktosa dan pewarnaan gram.

1.5.15.3 Klasifikasi biokimia adalah sebagai berikut :

Organisma	Indole	Methyl Red	Voges Proskauer	Sitrat
E. Coli				
– Varietas I	+	+	–	–
– Varietas II	–	+	–	–
E. freundii ("Intermediates")				
– Varietas I	–	+	–	+
– Varietas II	+	+	–	+
Enterobactor aero genes				
– Varietas I	–	–	+	+
– Varietas II	+	–	+	+

Lampiran 1: Media pembiakan

Beberapa dari formulasi media tercantum dalam lampiran ini tersedia secara komersial baik dalam bentuk dehidrasi atau yang langsung dapat digunakan. Kecuali adanya ketentuan-ketentuan yang diperlukan, formulasi komersial tersebut telah dibuktikan baik untuk digunakan pada metode pengujianyang tercantum di atas. Akan tetapi instruksi untuk penyiapan media harus benar-benar ditaati.

Beberapa formulasi komersial berbeda dengan formulasi aslinya, sebab (1) adanya beberapa modifikasi yang telah dikembangkan atau (2) pembuat media telah menemukan bahwa beberapa perbedaan konsentrasi dan jenis bahan, kontrol pH yang lebih baik, produktivitas, hambatan dan sebagainya-dapat dipertahankan. .Perubahan-perubahan ini biasanya mendorong kegunaan dari media untuk tujuan-tujuan tertentu. Perubahan-perubahan formula telah dibuktikan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan mikoorganisma jika dibandingkan dengan formula aslinya. Selain itu, pengawasan ,terhadap kualitas dari media komersial memerlukan pengujian-pengujian untuk produktivitas, hambatan dan sebagainya untuk setiap lot media dengan pengujian kontrol mikroorganisma terpilih secara hati-hati. Oleh sebab itu kualitas dari media dehidrasi pada umumnya mempunyai tingkat yang lebih baik dibandingkan dengan media yang dibuat di laboratorium.

Merupakan suatu hal yang hares dilakukan untuk menginokulasi 1 set mikroorganisma kontrol pada setiap lot media. Pelaksanaan ini sangat disarankan terutama pada laboratorium yang berhubungan dengan riset dan pengembangan metode analisa yang tergantung pada karakteristik biokimia spesifik dari mikroorganisma.

1. Brilliant Green Lactose Bile Broth, 2%

Peptone	10 g
Lactose	10 g
Oxgall	20
Brilliant Green	0.0133
Aquadest	1 liter

Larutkan peptone dan lactose dalam 50 ml aquadest. Tambahkan 20 g oxgall dehidrasi yang telah dilarutkan dalam 200 ml air. pH dari larutan ini harus antara 7.0 clan 7.5. Campurkan kedua lar .::an tersebut hingga mencapai volume 750 ml. Sesuaikan sampai pH 7.41. pH akhir setelah sterilisasi harus mencapai 7,2. Tambahkan 13.3 ml larutan brilliant green dalam aquadest dengan kadar 0.1%. Tambahkan aquadest secukupnya sampai mencapai volume 1 liter, pindahkan ke dalam tabung-tabung fermentasi. isi hingga larutan menutupi tabung yang ditaruh terbalik, dan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C.

2. EC Broth

Trypticase atau tryptone (enzim pancreatic dari casein)	20 g

Bacto bile salt 113 (atau bile salt mixture)	1,5 g
Lactose	5 g
Dipotassium phosphate (K. HPO_4)	4 g
Monopotassium phosphate (KH_2 PO_4)	1,5 g
Sodium chloride	5,0 g
Aquadest	1 liter

Larutkan bahan dan distribusi 5 ml ke dalam 16 x 150 mm tabung reaksi yang berisi 10 x 75 mm tabung fermentasi yang terbalik. Volume ini harus menutupi tabung fermentasi tersebut. Autoclave selama 25 menit pada suhu 121°C. pH akhir 6,9 ± 0,1.

3. Eosin — Methylene Blue Agar (Levine)

Peptone	10 g
Lactose	10 g
Dipotassium phosphate (K_2 HPO_4)	2 g
Agar	15 g
Eosin Y	0,4 g
Methylene blue	0,065 g
Aquadest	1 liter

Didihkan campuran peptone. phosphate dan agar dalam 1 liter dan tambahkan air sampai mendapat volume asli. Ambil 100 atau 20,0 ml dan autoclave selama 15 menit tidak lebih dari 121°C. pH akhir 7,1 0,2. Sebelum digunakan lelehkan. dan pada setiap 100 ml tambahkan (a) 5 ml larutan lactose 20% stern (b) 2,0 ml larutan 2% eosin Y dan (c) 4,3 ml larutan methylene blue 0,15%. Bila menggunakan produk dehidrasi didihkan untuk menghancurkan bahan dalam 1 liter air. Ambil 100 ml atau 200 ml dan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. pH akhir 7,1 = 0.1.

4. Glucose Broth (Mr — Vp Broth) — Buffered

Proteose peptone	7 g
Glucose	5 g
Dipotassium phosphate (K HPO_4)	5 g
Aquadest	1 liter

Apabila digunakan untuk kultur V. parahaemolyticu.s gunakan 30 g NaCl per liter. Larutkan peptone, glucose dan potassium phos[p]hate dalam 800 ml air dengan pemanasan yang sedang; saring, dinginkan hingga 20°C. encerkan hingga 1 liter. Pindahkan tiap 10 ml dalam tabung reaksi, dan autoclave selama 12—15 menit pada suhu 121°C. Maksimum pemanasan harus ≤ 30 menit. pH akhir 6,9 ± 0,2.

5. Koser's Citrate Broth

Sodium ammonium hidrogen phosphate ($NaNH_4$ $HPO_4.4H_2$ O)	1,5 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K_2 HPO_4)	1 g
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2$ O)	0,2 g
Sodium Citrate ($Na_3C_60;.2H_2O$)	3 g

Aquadest 1 liter

Larutkan dan bagikan tiap-tiap 10 ml ke dalam tahung Teaks: dan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. pH akhir 6.7 a 0,2.

Formulasi yang tercantum pada AOAC ini dan Standard Methods for the Examination of water and waste water dari APHA berbenda dengan formula media dehidrasi. Akan tetapi, media dehidrasi yang dihuat oleh Bioquest dan Difco telah dibuktikan cukup memuaskan.

6. Lauryl Sulfate Tryptose (Lst) Broth

Tryptose atau trypticase (enzim pankreas untuk casein)	20 g
Lactose	5 g
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	2,75 g
Monopotassium phosphate ($KH_2 PO_4$)	2,75 g
Sodium chloride	5 g
Sodium lauryl sulfate	0,1 g
Aquadest	1 liter

Larutkan semua bahan dan bagikan tiap 10 ml dalam 20 x 150 mm tabung reaksi yang berisi tabung fermentasi 10 x 75 mm terbalik. Larutan harus menutupi bagian tabung fermentasi setelah sterilisasi. Autoclave 15 menit pada suhu 121°C. pH akhir 6,8 ± 0,2.

7. Standard Methods Agar (Plate Count Agar)

TryptOne	5 g
Yeast extract-	2,5 g
Glucose	1 g
Agar	15 g
Aquadest	1 liter

Larutkan bahan dalam air sampai mendidih. Pindahkan ke dalam tabung-tabung atau labu-labu, dan autoclave 121°C, 15 menit. pH akhir 7,0 ± 0,1.

8. Trypticase Soy Agar

Trypticase peptone	15,0 g
Phytone peptone	5,0 g
Sodium chloride	5,0 g
Agar	15,0g
Aquadest	1000 ml.

Tambahkan bahan-bahan ke dalam arr. D:dihkan dengan mengaduk selama 1 me-:_t. Pindahkan medium pada tabung-tabung atau labu-labu yang cocok. Sterilisasi 121°C, 15 menit. pH akhir 7.3 = 0.2. Tambahkan 25 gr NaCl lagi apabila digunakan: untuk media t·. parahaemoly ticas.

9. Trypticase Soy — Tryptose Broth

Trypticase Soy Broth (Komersial dehidras:)	15 g
Tryptose Broth (Komersial dehidrasil	13.5 g

Yeast extract	3,0 g
Aquadest	1000 ml
Formula untuk Trypticase Soy Broth	
Trypticase peptone	17,0 g
Phytone peptone	3,0 g
Sodium chloride	5,0 g
Dipotassium hydrogen phosphate	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Aquadest	1000 ml
Formula untuk Tryptose Broth	
Bacto—tryptose	20,0 g
Sodium chloride	5,0 g
Bacto—dextrose	1,0 g
Aquadest	1000 ml

Kombinasi 15 g dehidrasi trypticase soy broth komersial 13,5 g, dehidrasi tryptose broth komersial, dan 3 g ekstrak yeast. Larutkan dalam 1 liter aquadest. Panaskan dan aduk hingga merata. Panaskan perlahan-lahan jika perlu, Autoclave 121°C, 15 menit. pH akhir 7,2 ± 0,2.

Analis harus mempunyai alasan dalam menggunakan satu formula atau kombinasi ke dua dengan penambahan 0,3% ekstrak yeast. Salah satu dari ke dua media tersebut memuaskan untuk kultur Salmonella dalam pengujian serologi flagellar. Akan tetapi, kombinasi kedua media telah disarankan.

Lampiran 2: Reagensia

1. Reagensia Kovac

p—Dimethylaminobenzaldehyde	5 g
Amyl alcohol atau isoamyl alcohol	75 ml
Hydrochloric (pekat)	25 ml

Larutkan p—Dimethylaminobenzaldehyde dalam amyl alcohol atau isoamyl alcohol, dan kemudian perlahan-lahan tambahkan hydrochloric acid. Simpan dalam suhu 4°C. Untuk pengujian indol, tambahkan 0,2—0,3 ml reagensia ke 5 ml kultur bakteri pada tryptone broth yang telah diinkubasi 24 jam. Warna me-rah pada lapisan atas menunjukkan hasil positif. Untuk enteropatogenik E. coli, juga diuji setelah 72 jam apabila pada 24 jam memberikan hasil negatif.

2. Indikator Methyl Red

Methyl red	0,01 g
Alcohol (ethyl) 95%	300 ml
Aquadest secukupnya untuk membuat	500 ml

Larutkan methyl red dalam 300 ml alcohol, dan buat hingga 500 ml dengan aquadest.

3. Reagensia Tes Voges — Proskauer (Vp)

Larutan 1

a—Napthol	5 g
Alcohol (absolut)	100 ml Larutan 2
Potassium hydroxide	40 g
Aquadest	100 ml

Lakukan tes VP pada suhu ruang dengan memindahkan 1 ml kultur yang berumur 4S jam ke dalam tabung reaksi dan tambahkan 0,6 ml a—Napthol(larutan 1) dan 0,2 ml KOH 40% (larutan 2); kocok setelah penambahan tiap-tiap larutan. Untuk memperoleh reaksi yang cepat dan intensif, tarnbahkan beberapa krisral creatine dalam tes medium. Bila hasilnya setelah 4 jam penambahan reagensia-reagensia. Tes VP positif bila terbentuk warna merah muda eosin.

Lampiran 3: Pewarnaan gram

1. Hucker's Crystal Violet

Larutan A

Crystal violet mengandung 90 % warna)	2 g
Ethyl alcohol (95 %)	20 ml

Larutan B

Ammonium oxalate	0,8 g
Aquadest	80 ml

Campur larutan A dan B. Simpan selama 24 jam dan saring melalui kertas penyaring kasar.

2. Gram's Iodine

Iodine	1 g
Potassium iodine	2 g
Aquadest	300 ml

Letakkan ICI dalam mortar. tambahkan iodine, dan giling dengan alat penggiling selama 5-10 detik. Tambahkan 1 ml air an giling, kemudian 5 ml air dan giling. ialu 10 ml dan giling. Pada saat mi KI dan iodine men adi suatu larutan. Tuang dalam hotol reagensia. Bilas mortas dan penggii:ng dengan air yang cukun hingga diueroleh volume 300 ml.

3. Hucker's Counterstain (Larutan Stok)

Safranin Di disertifikasi	2.5 g
Ethyl alcohol (95'%1	100 ml

Penggunaannya, tamhahkan 10 ml larutan stok ke dalam 90 ml aquadest.

4. Prosedur Pewarnaan

Fiksasi film yang kering karena diangin anginkan dengan melewarkan film melalui api burner dengan cepat sehanyak 3-4 kali.

Warnai film selama 1 menit dengan larutan kristal violet ammonium oxalate dan cuci sebentar dengan air mengalir (jangan lehih dari 5 detik). Bubuhkan Gram Iodine selama 1 menit. Cuci dengan air kran. Dekdorisasi dengan 95 ethyl alcohol sampai tidak ada lagi warna biru (sekitar 30 detik). Sebagai prosedur alternatif, rendam slide dengan alcohol. segera angkat. dan renclam lagi dengan alcohol selama 10 detik.

Cuci, dan hilangkan kelehihan air, dan huhuhkan safranin counterstain selama 1 menit.

Beberapa dari organisma-organisma gram-negatif tidak dapat segera melepaskan vvarna setelah diadakan pewarnaan dengan Hucker's crystal violet. Bila bekerja dengan gonoccus, encerkan larutan crystal violet 1 : 5 dengan aquadest dan campur 1 hagian larutan crystal violet yang diencerkan tersehut dengan 4 bagian larutan amonium oxalate. Bila hekerja dengan bakteria anaerob, campur 1 hagian Hucker's crystal violet dengan 1 hagian sodium

bicarbonate 1%, segera sehelum pewarnaan.

Lampiran 4: Mpn — Most probable number

1 Pendahuluan

Teknik Most Probable Number (MPN) menggunakan pendekatan "pengenceran berganda hingga punah" yang telah dibuktikan sangat baik untuk memperkirakan populasi mikroorganisma, terutama pada situasi di mana.mikroorganisma ada dalam jumlah yang sangat sedikit, di mana makanan tertentu dapat menyulitkan metode penghitungan lainnya, atau di mana media tertentu atau sistem pembiakan tertentu dibutuhkan. Untuk sebagian besar produk-produk makanan dan bahan,-bahan makanan, struktur contoh, atau karakteristik lainnya, dapat menvulitkan penggunaan prosedur penghitungan kolohi apabila densitas mikroorganisma per gram makanan berjumlah kurang dari 10. Dalam' keadaan ini, metode MPN sangat berguna untuk memperkirakan jumlah mikroba, terutama untuk populasi yang sangat sedikit. Contoh penggunaan dari metode ini adalah untuk memperkirakan conform di air, produk-produk ternak dan jenis-jenis makanan lain.

Pada makanan yang terkontaminasi, baik secara alamiah atau insidensial, distribusi mikroorganisma pada produk makanan dapat terjadi pada permukaan makanan, dapat tersebar secara homogen pada seluruh makanan atau terdapat pada bagian tertentu dalam makanan. Nilai-nilai yang terdapat pada tabel ~IPN di-hitting berdasarkan dari asumsi bahwa mikroorganisma yang dicari berada dalam contoh makanan secara homogen. Pada contoh makanan dan larutannya, lemak dan partikel yang tidak dapat larut akan menghalangi tingkat homogenitas yang diasumsikan. Karena alasan ini. maka nilai \IPN yang diperoleh ciari contoh makanan akan kurang akurat dari pada nilai IPN yang diperoleh dari air di mana homogenitas contoh lebih mudah di dapat.

Pada umumnya, basil yang diperoleh clan prOsedit:r \iPN kurang akurat dibandingkan dengan prosedur penanaman. \lisalnya, pada penghitungan Enterobacter cerogenes, prosedur penanaman non-selektif lebih baik dari pada MPN. :lpabila organisme yang sama akan dihitung pada contoh-contoh seperti air sungai, di rnana spesies bakteri dom nan lain juga ada, prosedur MPN dapat dipil:h. Kadang keakurasian harus diabaikan, sebab kurangnya prosedur penanaman yang baik, atau adanya kebutuhan untuk menguji larutan contoh dalam volume yang besar yang dipenuhi dengan material-material tertentu dan tercampur dengan spesies-spesies bakteri lainnya.
Tergantung dari pengambilan contoh dan informasi yang dicari, contoh harus dicampur (ciiaduk) atau dimaserasi untuk mendapatkan distribusi mikroorganisma yang homogen. Pada saat contoh yang homogen dibagi menjadi sub-contoh melalui suatu serf pengenceran, beberapa dari sub-contoh akan mengandung sejumlah kecil contoh yang mana ini tidak mengandung mikroorganisma yang dicari. Ada dan tidak adanya sel-sel mikroba dalam sub-

contoh dapat digunakan untuk secara statistik memperkirakan populasi mikroba dalam contoh aslinya. \letode MPN didasarkan pada pembagian contoh dan oleh karena itu dapat digambarkan sebagai "metoda pengenceran berganda punah". Akurasi dari satu kali pengujian tergantung dari jumlah tabung yang digunakan untuk tiap pengenceran. Informasi yang sangat memuaskan akan diperoleh apabila semua tabung dengan porsi besar menunjukkan pertumbuhan, dan tabung-tabung dengan porsi kecil menunjukkan tidak adanya pertumbuhan.

2 Penanganan Contoh

Pengumpulan contoh, pengirimannya dan pemeriksaan contoh harus dilakukan dengan cara aseptis dan dapat mewakili lot makanan yang diperiksa. Penggunaan alat-alat pengujian, media dan reagensia serta pelaksanaan pengujian harus sesuai dengan jenis bakteri yang ditentukan.

Dalam pengujian contoh, disarankan untuk menggunakan satu set tabung dari setiap kelompok medium yang diuji sebagai kontrol yang tidak diinokulasi. Seandainya, sebagai contoh, metode MPN 5 tabung yang digunakan, maka 1 set berisi 5 tabung harus diinkubasi sebagai kontrol yang tidak diinkubasi untuk meyakinkan bahwa medium yang digunakan benar-benar steril. Selain itu temperatur inkubator juga harus dikontrol.

3 Keterbatasan Metode Mpn

Metode ini umumnya digunakan apabila densitas mikroba dalam makanan adalah rendah; oleh sebab itu, lebih umum digunakan contoh dalam ukuran yang besar. Apabila contoh mengandung substansi penghambat, atau contoh :-u sendiri adalah penghambat (yaitu NaC11, pertumbuhan dalarn tabung-tabung dengan konsentrasi contoh yang tinggi akan terhambat.
1\iletode MPN untuk penghitungan umumnya digunakan untuk menentukan jumlah mikroorganisma dari jenis-jenis tertentu. Pada saat ini digunakan media-rnedia selektif untuk beberapa jenis mikoorganisma. Janis bakteri yang dapat clihitung mellput'i salmonella, staphylococcus, coliform, faecal coliform E. coif dan lain-lainnya.

4 Prosedur

Pengaturan dan pengenceran contoh untuk metoda MPN identik dengan prosedur untuk penghitungan kolnni. Perbandingan volume medium hams dinertimbangkan. Pada dasarnya. 1 bagian dan 10 hagian madan hams digunakan. Jadi, apabila 10 g contoh digunakan, ini harus ciilarutkan ke dalam 100 ml medium. Apabila mikoorganisma ada dalam cairan atau dalam contoh yang dilarutkan akan clihitung, konsentrasi dari medium dapat disesua:kan sehingga konsentrasi medium setelah ditamhahkan contoh akan sesuai dengan medium berkekuatan tunggal. Apabila medium berkekuatan ganda digunakan maka dapat

ditamhahkan contoh atau larutan pengenceran dalam jumlah yang setara.

Apabila menggunakan contoh yang tidak menimbulkan partikel-partikel seperti awan dalam medium, terhentuknya endapan setelah inkuhasi dapat digunakan untuk mendeteksi pertumbuhan (tahung positif). Akan tetapi. dalam heberapa kasus contoh dapat terlihat dengan jelas sehingga endapan tidak dapat terlihat. Untuk ini, hares digunakan metode lain.

Gas yang diproduksi akibat aktivitas mikroorganisma dapat ditangkap dan diperiksa. Ini dapat dilakukan dengan alat penangkap gas atau tabung kecil yang diletakkan terbalik dalam medium sehelum dilakukan sterilisasi. Reaksi positif terjadi apabila terdapat gelembung-gelembung gas di dalam tahung terbalik tersebut.

5 Pembacaan Data

Apabila metoda tabung berganda digunakan, hasilnya dinyatakan sebagai "most probable number mikoorganisma per gram". Tabel II dan III menunjukkan most probable number mikroorganisma yang setara dengan frekuensi tabung-tabung positif, yang diperoleh dari variasi sistem inokulasi porsi berganda yang dimulai dengan tes 1 inl bagian dari pengenceran 1 : 10 (0,1 g bagian). Karena kemungkinan lebih dari 1 mikroorganisma bertanggung jawab terhadap hasil pengujian yang positif, penghitungan dari MPN mikroorganisma menggunakan fungsi logaritma. Untuk mendapatkan nilai MPN, tentukan jumlah setiap tabung positif dari 3 Denaenceran terpilih. Lihat tabel MPN dan catat hasilnya.

Tabel 1 Tabel I ebih dari 3

Contoh dan pemecahan hasil yang diperoleh apabila lebih dari 3 porsi berbeda digunakan.

Contoh	0,1 g	0,01 g	0,001 g	0,0001 g
a)	5/5 *	5/5	2/5	0/5
b)	5/5	4/5	2/5	0/5 *
c)	0/5	1/5	0/5	0/5 *
d)	5/5	3/5	1/5	1/5
e)	5/5	3/5	2/5	0/5 *

* Apabila semua tabung memberikan nilai positif, pilih 3 volume terkecil yang diuci, dan tanda lebih besar (>) digunakan untuk menunjukkan bahwa nilai MPN lebih besar dari yang diberikan.

Apabila lebih dari 3 volume berbeda digunakan, gunakan hasil hanya 3 volume berturut-turut (tabel 1). Gunakan hasil dari volume terkecil yang mana memberikan hasil 5.5, dan hasil yang diperoleh pada dua volume berikutnya. Hasil dari contoh ini adalah ekstrim angka dengan tanda (*) tidak ooleh digunakan dalam penghitungan. Contoh c di mana tidak ada satu volume pun yang mernberikan hasil volume tengah..Apabila hasil positif terjadi pada

volume yang lebih kecil dari tiga volume yang dipilih sesual dengan ketentuan (contoh d), tambahkan nilai yang lebih tinggi dari batas hasil ke nilai di atas batas yang berasal dari volume terkecil yang dipilih, sehingga memberikan hasil seperti pada contoh e.

Terkadang dirasakan perlu untuk menghitung MPN dari volume terdahulu dari yang tercantum dalam tabel II dan III. Apabila porsi tertinggi yang digunakan untuk tabel acuan adalah 0,01 g dari pada 0,1 g, kalikan nilai MPN pada tabel dengan 10.
Oleh sebab itu, hasil dari penentuan MPN dengan 5 tabung yang menunjukkan 3 tabung positif dengan porsi 0.01 g. 2 positif dengan porsi 0,001 g, dan 1 positif dengan porsi 0.0001 g (3-2-1) yang berdasarkan tabel II menunjukkan hasil 17, dan dikalikan dengan 10 untuk mendapatkan nilai 170 sebagai hasil MPN/g contoh. Begitu juga, apabila porsi tertinggi yang digunakan untuk tabel acuan adalah 10.0 g bukan 0,1 g, bagi nilai MPN dari tabel dengan 100. Oleh sebab itu, hasil dari penentuan MPN dengan 3 tabung untuk salmonella yang memberikan hasil 3 positif pada seluruh tabung dengan porsi 10 g 1 positif dengan porsi 1 g, dan tidak ada tabung positif dengan porsi 0,1 g (3-1-0), yang berdasarkan tabel III menunjukkan hasil 43, dan dibagi dengan 100 untuk mendapatkan nilai 0,43 sebagai hasil MPN/g contoh.
Cara penghitungan lain untuk mendapatkan nilai MPN per gram makanan adalah dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{MPN dari tabel}}{100} \times \text{faktor pengenceran dari tabung tengah} = \text{MPN /gram.}$$

Semua pengamatan statistik tercantum dalam batas kepercayaan yang tercantum dalam ke dua tabel tersebut. Interpretasi dari batasan-batasan tersebut adalah apabila seseorang mengatakan bahwa densitas sebenarnya dari organisma berkisar antara kedua batasan ini, maka ia akan berada pada 95% dari pemyataannya.

Penghitungan mikrobiologi harus dicatat sebagai "jumlah mikroorganisrna per kuantitas contoh dengan metoda MPN", contohnya, MPN coloform = 10/g. Dalam pelaporannya perlu pula dijelaskan jumlah tabung yang digunakan untuk tiap pengenceran. misalnva 5 tabung MPN atau 3 tabung MPN dan metode yang digunakan.

Tabel II.

Most Probable Number (MPN) per 1 g contoh dan 95% tingkat kepercayaan.

Menggunakan lima tabung dengan porsi 0,1; 0,01; 0,001					
Jumlah Positif			MPN	Batas MPN	
0.1	Tabung 0,01	0,001	/gr	Bawah	Atas
5	2	2	94	28	219
5	2	3	120	33	281
5	2	4	148	38	366
5	2	5	177	44	515
5	3	0	79	23	187
5	3	1	109	31	251
5	3	2	141	37	343
5	3	3	175	44	503
5	3	4	212	53	669
5	3	5	253	77	788
5	4	0	130	35	300
5	4	1	172	41	484
5	4	2	221	57	698
5	4	3	278	90	849
5	4	4	345	117	999
5	4	5	436	145	1161
5	5	0	240	68	734
5	5	1	348	118	1005
5	5	2	542	180	1405
5	5	3	920	210	3000
5	5	4	1600	350	5300
5	5	5	> 1600	600	—

* Jumlah tabung positif pada ke lima yang diuji.

Tabel III.

Most Probable Number MPN per 1 g contoh dan 95% tingkat kepercayaan.

Menggunakan tiga tabung dengan porsi 0,1; 0.01; 0.001					
Jumlah Positif			MPN	Batas MPN	
0,1	Tabung 0,01	0,001	/gr	Bawah	Atas
0	0	0	< 3	—	—
0	0	1	3	0,5	9
0	1	0	3	< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44